

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-502254

(P2002-502254A)

(43) 公表日 平成14年1月22日 (2002.1.22)

(51) Int.Cl. ¹	識別記号	P I	チマコト* (参考)
A 2 3 K 1/165		A 2 3 K 1/165	C
C 1 2 N 9/98		C 1 2 N 9/98	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願平11-501509	(71) 出願人	デーエスエム・ナムローゼ・フェンノート シャップ
(86) (22) 出願日	平成10年6月4日 (1998.6.4)		オランダ、エヌエル-6411デーエー・ヘー ルレン、ヘット・オーフェルローン1番
(85) 翻訳文提出日	平成11年12月3日 (1999.12.3)	(72) 発明者	バーレントセ、ルドルフ・カロルス・マリ ア
(86) 国際出願番号	P C T / E P 9 8 / 0 3 3 2 7		オランダ、エヌエル-2613セーエム・デル フト、ファン・ボセストラート9番
(87) 国際公開番号	W O 9 8 / 5 4 9 8 0	(72) 発明者	メーステルス、ガブリエル・マリヌス・ヘ ンリクス
(87) 国際公開日	平成10年12月10日 (1998.12.10)		オランダ、エヌエル-2614デーイエー・デ ルフト、ホフ・ファン・サフィール9番
(31) 優先権主張番号	9 7 2 0 1 6 4 1 . 4	(74) 代理人	弁理士 青山 藤 (外1名)
(32) 優先日	平成9年6月4日 (1997.6.4)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	ヨーロッパ特許庁 (E P)		
(31) 優先権主張番号	6 0 / 0 4 8 , 6 1 1		
(32) 優先日	平成9年6月4日 (1997.6.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 炭水化物をベースとする酵素粒状物

(57) 【要約】

水性酵素含有液をデンプンのような食用の炭水化物をベースとする固形担体と混合し、顆粒に機械的に加工処理し、次いで乾燥させる、酵素含有粒状物の製法を開示する。該酵素粒状物は、飼料成分を該粒状物と混合し、蒸気処理し、ペレット成形することによる動物飼料組成物の製造に適する。該組成物は、ペレット成形工程の間、改善された酵素安定性を示す。

(2)

特表2002-502254

【特許請求の範囲】

1. 酵素、少なくとも15% (w/w) の食用炭水化物ポリマーを含む固形担体および水を適当な相対量で加工処理して酵素含有顆粒を得、次いで顆粒を乾燥させることからなる、動物飼料における使用に適する酵素含有粒状物の製法。
2. 水および酵素が酵素含有水性液体として提供される請求項1記載の製法。
3. 液体が酵素の生産をもたらす発酵工程由来の濾液である請求項2記載の製法。
4. a) 酵素を含有する水性液体を固形担体と混合し；
b) a) で得られた混合物を機械的に加工処理して酵素含有顆粒を得；
c) b) で得られた酵素含有顆粒を乾燥させることからなる、前記請求項のいずれか1項記載の製法。
5. 加工処理が機械的であって、押出し成形、ペレット成形、高剪断造粒、膨張、流動層凝集またはそれらの組み合わせからなる、前記請求項のいずれか1項記載の製法。
6. 酵素含有水性液体および固形担体を混合し、得られた混合物を造粒前に練合する、前記請求項のいずれか1項記載の製法。
7. 加工処理が低圧および／またはバスケットもしくはドーム押出し成形機で行われる押出し成形である、前記請求項のいずれか1項記載の製法。
8. 得られた顆粒を乾燥前に球状にする前記請求項のいずれか1項記載の製法。
9. 前記請求項のいずれか1項記載の製法により製造できる酵素含有粒状物。
10. 酵素および少なくとも15% (w/w) の食用炭水化物ポリマーを含む固形担体から形成される乾燥顆粒を含んでなる粒状物。
11. 顆粒が少なくとも1個の二価カチオンを含む請求項9または10記載の粒状物。
12. 顆粒が1以上の疎水性のゲル形成または水不溶性化合物を含む請求項9～11のいずれか1項記載の粒状物。
13. 疎水性のゲル形成または水不溶性化合物が誘導体化セルロース、ポリビニルアルコール (PVA) または食用油を含む請求項12記載の粒状物。

(3)

特表2002-502254

14. 誘導体化セルロースがヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロースであり、および／または食用油が大豆油もしくはカノーラ油である請求項13記載の粒状物。
15. 酵素がフィターゼ、エンドキシラナーゼおよび／または β -グルカナーゼを含む請求項9～14のいずれか1項記載の粒状物。
16. 請求項9～15のいずれか1項記載の粒状物を1以上の動物飼料物質または成分と混合することからなる、動物飼料、または動物飼料のプレミックスもしくは前駆物質の製法。
17. 飼料物質および粒状物の混合物を滅菌または蒸気処理し、ペレット成形し、所望により乾燥させる請求項16記載の製法。
18. 請求項9～15のいずれか1項記載の粒状物を含んでなる組成物。
19. 食用飼料組成物である請求項18記載の組成物。
20. 動物飼料である請求項18または19記載の組成物。
21. 請求項9～15のいずれか1項記載の粒状物と混合した1以上の飼料物質または成分のペレットを含んでなる請求項18～20のいずれか1項記載の組成物。
22. 粒状物：飼料物質または成分の比率が少なくとも1g：1kg（例えば、少なくとも100 μ m）である請求項21記載の組成物。
23. 請求項16または17記載の製法により調製できる動物飼料、または動物飼料のプレミックスもしくは前駆物質である請求項18～22のいずれか1項記載の組成物。
24. 動物に請求項9～15のいずれか1項記載の粒状物または請求項18～23のいずれか1項記載の組成物のいずれかを含んでなる食餌を与えることからなる、動物の成長を促進する方法。
25. 動物飼料における、または動物飼料の成分としての、または動物用食餌における請求項9～15のいずれか1項記載の粒状物の使用。
26. 酵素のペレット成形安定性を改善するために、少なくとも15%（w/w）の食用炭水化物ポリマーを酵素の担体として含んでなる組成物の使用。

(4)

特表2002-502254

27. 酵素含有液および少なくとも15% (w/w) のデンプンを含む固形担体を機械的に加工処理して酵素含有顆粒を得、次いでそれを乾燥させる、酵素含有粒状物の製法。

(5)

特表2002-502254

【発明の詳細な説明】

炭水化物をベースとする酵素粒状物

発明の分野

本発明は、酵素、好ましくは飼料酵素の炭水化物（例えば、デンプン）含有粒状物への処方に関し、かかる酵素含有粒状物の製法に関する。次いで、これらの（食用の）粒状物は、動物飼料において使用することができる。

発明の背景

動物、例えば、家畜の飼料における種々の酵素の使用は、ほとんど一般的な習慣になってきた。これらの酵素は、通常、産業上の酵素生産者によって行われる大規模な発酵槽における微生物の培養によって生産される。発酵の最後に得られる「ブイヨン」を、通常、一連の濾過段階に付して、バイオマス（微生物）を所望の酵素（溶液中）から分離する。次いで、酵素溶液は、液体として販売されるか（しばしば、種々の安定化剤の添加後に）、または乾燥製剤に加工処理する。

酵素液および乾燥製剤は、飼料産業によって商業的規模で使用される。ペレット成形工程の間に起こるであろう酵素の熱不活性化を回避するために、ペレット成形の後、液体製剤を飼料に加えてもよい。しかしながら、最終的な飼料調製物中の酵素量は、通常、非常に小さく、飼料中の酵素の均一な分散を達成するのは困難であり、よく知られているように、液体は乾燥成分よりも均一に混合するのが困難である。さらに、ペレット成形後に液体を飼料に加えるには、特別の（高価な）装置が必要であり、それは、目下、大抵の飼料製造所では利用できない（余分な費用のため）。

一方、酵素の乾燥製剤には、ペレット成形の間の酵素の熱不活性化という不利益がある。飼料産業における好ましい製造プロトコールは、飼料をペレット成形前に蒸気注入に付す蒸気ペレット成形を含む。続くペレット成形段階において、飼料をマトリックスまたはダイに押し通し、得られた細片を種々の長さの適当なペレットに切断する。ペレット成形直前の水分含量は、一般に、18%～19%

である。該工程の間、温度は60～95℃に上昇し得る。高水分含量および高温

(6)

特表2002-502254

度の合わせた影響は、ほとんどの酵素に不利益である。これらの不利益は、また、押出し成形および膨張のような他の型の熱動力的処理において直面する。

これらの問題に挑戦し、克服するために、EP-A-0, 257, 996 (Cultor Ltd) は、酵素含有溶液が穀粉からなる穀物をベースとする担体上に吸収されている酵素「プレミックス」の調製によって、飼料加工処理における酵素の安定性を向上できることを示唆し、次いで、プレミックスはペレット成形し乾燥させる。しかしながら、これらの穀粉をベースとするプレミックスは、穀粉をベースとするプレミックスのにかわ質の特徴のため、(ドー様プレミックスを)粒状物に加工処理する低圧押出し成形または高剪断造粒のようなより穏かな方法に適さない。

種々の酵素製造業者は、ペレット成形および貯蔵の間の乾燥酵素産物の安定性を改善しようとするために、別法の処方を開発させた。

EP-A-0, 569, 468 (Novo Nordisk) は、ペレット成形条件に対する耐性を改善するといわれる高融解ワックスまたは脂肪で被覆された酵素含有「T-粒状物」からなる製剤を言及している。該粒状物は、高剪断造粒機中で乾燥無機(例えば、硫酸ナトリウム)充填剤を酵素溶液と混合することによって調製する。EP-A-0, 569, 468は、ペレット成形安定性に関して、被覆のいずれかの有益な効果が被覆された粒状物の型、この場合、硫酸ナトリウム充填剤に基づく型に特異的であることを教示している。しかしながら、これらの(硫酸ナトリウム)充填剤の吸収能力は、穀粉のような担体よりも非常に小さく、より高濃度の酵素含有粒状物を製造しようとする場合、望ましくない。

さらに、粒状物は、幅広い粒子サイズ分布を有し、始終均一な酵素濃度を得ることは困難である。そのうえ、酵素の動物に対する生物学的利用能は、ワックスまたは脂肪被覆によって減少する。

また、WO-A-97/16076 (Novo Nordisk) は、粒子におけるワックスおよび他の水不溶性物質の使用を言及しているが、ここではマトリックス材料として用いられている。

したがって、ペレット成形以外の造粒方法に適し、高吸収能を有することがで

(7)

特表2002-502254

きる担体に基づく酵素の安定な製剤に対する要望がある。

発明の記載

本発明の第1の態様において、酵素、少なくとも15% (w/w) の食用炭水化物ポリマーを含む固形担体および水を適当な相対量で加工処理して、酵素含有顆粒を得、次いで、顆粒を乾燥させることからなる、動物飼料における使用に適する酵素含有粒状物の製法が提供される。該方法により製造できる酵素含有粒状物（本発明の第2の態様を形成し、また、酵素および少なくとも15% (w/w) の食用炭水化物ポリマーを含む固形担体から形成される乾燥顆粒を含んでなる粒状物を包含する）は、先行技術で直面した問題を解決するか、または少なくとも緩和しようとする。

したがって、本発明は、担体として炭水化物を使用する粒質形態の酵素製剤の製法を提供する。担体は、粒子または粉末形態であってもよい。酵素および水は、好ましくは、溶液またはスラリーのような酵素含有（好ましくは水性）液として提供され、それを固形担体と混合し、担体上に吸収させることができる。混合の間または後、酵素含有液および担体を粒状物に加工処理し、次いで、それを乾燥させることができる。炭水化物担体の使用は、大量の酵素含有液（したがって酵素）の吸収を可能にし得る。容易に顆粒に加工処理できる、例えば、押出し成形できる成形力のあるペーストまたは弾性のないドーを形成させるために、混合物を使用してもよい。適当には、担体は、より容易な造粒を可能にする非繊維質であり；繊維状物質は押出し成形による造粒を妨げることができる。

いくつかの先行技術は種々の酵素を含有するペレットについて記載しているが、これらは界面活性剤としての、しばしば、洗浄組成物における使用を見出している。対照的に、本出願は、動物飼料における使用を見出し、それゆえ、本発明の粒状物は食用に適し（動物による）、また、好ましくは消化できる。したがって、本発明の粒状物、顆粒および組成物がほんの少し例を挙げれば、石炭、界面活性剤および漂白剤または漂白化合物、沸石、結合剤、充填剤（ TiO_2 、カオリン、ケイ酸塩、タルク等）ではないことは、驚くべきことではない。

食用炭水化物ポリマーは、飼料の目的となる動物による食用に適し、好ましく

(8)

特表2002-502254

は、そのうえ消化できるように選択されるべきである。ポリマーは、好ましくは、グルコース（例えば、グルコース含有ポリマー）または $(C_6H_{10}O_5)_n$ 単位を含む。好ましくは、炭水化物ポリマーは、 α -D-グルコピラノース単位、アミロース（線状（1→4） α -D-グルカンポリマー）および／またはアミロペクチン（ α -D-（1→4）および α -D-（1→6）結合を有する分枝D-グルカン）を含む。デンプンは、好ましい炭水化物ポリマーである。デンプンの代わりにまたはデンプンに加えて使用できる他の適当なグルコース含有ポリマーは、 α -グルカン、 β -グルカン、ペクチン（例えば、プロトペクチン）およびグリコーゲンを包含する。糊化デンプンは最も良く避けられ、したがって存在しなくてもよいにもかかわらず、これらの炭水化物ポリマーの誘導体、例えば、それらのエーテルおよび／またはエステルもまた、考慮される。適当には、炭水化物ポリマーは水不溶性である。

本明細書に記載の実施例において、コーン、ジャガイモおよび米デンプンが使用される。しかしながら、タピオカ、キャッサバ、小麦、トウモロコシ、サゴ、ライ麦、大麦、ヤマイモ、モロコシまたはクズウコンのような他の（例えば、野菜または穀物のような植物）供給源から得られるデンプンは、等しく適用できる。同様に、天然または修飾（例えば、デキストリン）型の両方のデンプンが本発明に使用できる。好ましくは、炭水化物（例えば、デンプン）は、タンパク質をほとんど含まないか、または全く含まず、例えば、5%（w/w）未満、たとえば、2%（w/w）未満、好ましくは、1%（w/w）未満である。デンプン（または他の炭水化物ポリマー）の型にかかわらず、動物飼料において使用できる形態であるべきであり、換言すれば、食用または消化可能な形態であるべきである。

固形担体の少なくとも15%（w/w）で、炭水化物ポリマー（例えば、デンプン）を含んでもよい。好ましくは、しかしながら、固形担体の少なくとも30%（w/w）で炭水化物を含み、最適には少なくとも40%（w/w）である。有利なことに、固形担体の主要な成分は、例えば50%（w/w）以上、好ましくは少なくとも60%（w/w）、適当には少なくとも70%（w/w）、最適には少なくとも80%（w/w）の炭水化物（例えば、デンプン）である。これ

(9)

特表2002-502254

らの重量パーセンテージは、最終的な乾燥粒状物中の非酵素的成分の全重量に基づいている。

本発明の方法において、酵素および水は、固形担体に接触前に同じ組成物中に存在していてもよい。これに関し、酵素含有水性液体を提供してもよい。該液体は、発酵工程由来の、または発酵工程から誘導される溶液またはスラリーであってもよい。該発酵工程は、通常、酵素を生産するものであろう。発酵工程は、微生物（所望の酵素を生産する）および水性溶液を含有するブイヨンを生じてもよい。一旦、微生物から分離された（例えば、濾過によって）該水性溶液が、本発明で使用される酵素含有水性液体である。したがって、好ましい具体例において、酵素含有水性液体は濾液である。

担体上に吸収され得る酵素含有液体（およびその酵素）の量は、通常、吸収され得る水の量によって制限される。天然の粒状デンプンの場合、これは、高温（デンプンの膨張を引き起こす）を用いることなく、25-30%（w/w）で変化できる。酵素含有液は通常、かなりの量の固形物を含有するので、実際、炭水化物に加えらるべき酵素液のパーセンテージは、しばしば、これよりも大量である。酵素溶液は、約25%（w/w）固形物を含有でき、その結果、炭水化物（例えば、デンプン）および酵素溶液は、0.5:1~2:1、例えば、1.2:1~1.6:1の炭水化物:酵素溶液比で、例えば、各々、約60%（w/w）:40%（w/w）の比率で混合できる。好ましくは、固形担体に加えらる液体の量は、（実質上、）（水性）液体中の全ての水が固形担体中に存在する炭水化物によって吸収されるような量である。

高温にて、デンプンおよび他の炭水化物ポリマーは、膨張下で大量の水を吸収できる。この理由で、炭水化物ポリマーは望ましくは、水（または酵素含有水性液体）を吸収できる。例えば、コーンスターチは、60℃でその重量の3倍までの水を吸収でき、70℃で10倍までを吸収できる。したがって、より大量の酵素含有液を吸収するために、より高温の使用が本発明により意図され、実際に、熱安定性酵素を扱う場合、特に好ましい。したがって、これらの酵素の場合、固形担体および液体（または酵素および水）の混合は、高温（例えば、周囲の温度

(10)

特表2002-502254

以上)、例えば、30℃以上、好ましくは40℃以上、最適には50℃以上で行うことができる。別法またはさらに、該温度で液体が提供されてもよい。

しかしながら、一般に、より低い(例えば、周囲の)温度で膨張しない条件が好ましい。これは、より高温での(熱感受性)酵素の不安定性から生じる活性の喪失を最小限にし得る。適当には、酵素および水の混合の間の温度は、20～25℃である。

酵素、水(例えば、酵素含有液)および固形担体の混合物を顆粒にする(換言すれば、造粒する)ための本発明で使用する機械的加工処理は、食物、飼料および酵素処方工程において頻繁に用いられる既知技術を用いることができる。これは、膨張、押出し成形、球状化(spheronisation)、ペレット成形、高剪断造粒、ドラム造粒、流動層凝集またはそれらの組み合わせを含んでもよい。これらの工程は、通常、機械的エネルギーの投入、例えば、スクリュウの駆動、混合機械装置の回転、ペレット成形装置の回転機械装置の圧力、流動層凝集機の回転底プレートによる粒子の移動またはガス流による粒子の移動、あるいはそれらの組み合わせによって特徴付けられる。これらの工程は、固形担体(例えば、粉末形態の)を酵素および水、例えば、酵素含有液体(水性溶液またはスラリー)と混合し、次いで、造粒させる。

別法では、固形担体を酵素(例えば、粉末形態の)と混合でき、次いで、それに水、例えば、液体(またはスラリー)を加える(それは、造粒液体として作用できる)。

本発明のさらなる具体例において、粒状物(例えば、凝集塊)は、例えば、流動層凝集機において、酵素含有液を担体上に噴霧または被覆することによって形成される。ここに、得られる顆粒は、流動層凝集機において生産できるような凝集塊を包含できる。

好ましくは、酵素含有液および固形担体の混合は、付加的に、混合物の練合を含む。これは、造粒(例えば、押出し成形)を容易にするために、混合物の可塑性を改善し得る。

粒状物が押出し成形によって形成される場合、好ましくは、低圧で行われる。

(11)

特表2002-502254

これは、押出し成形されている混合物の温度が上昇しないか、またはわずかしが上昇しないという利益を提供し得る。低圧押出し成形は、例えば、F u j i P a u d a l バスケットまたはドーム押し出し成形機における押出し成形を包含す

る。好ましくは、押出し成形されている物質の温度は40℃以上に上昇しない。押出し成形は、自然に顆粒（顆粒はダイを通過後に分離し得る）を製造してもよく、またはカッターを使用してもよい。

適当には、顆粒は30～40%、例えば33～37%の水分含量を有するであろう。酵素含量は、好ましくは、3～15、例えば、5～12%（例えば、少なくとも50,000ppm）である。

得られた顆粒は、例えば、球状成形機（spheromiser）、例えば、MARUM E R I S E RTM（登録商標）機中で、丸状化（例えば、球状化）および／または圧縮に付すことができる。最終的な粒状物中のダスト形成を減少させ、および／または粒状物のいずれかの被覆を容易にし得るので、顆粒を乾燥前に球状にしてもよい。

次いで、顆粒を例えば、流動層乾燥機中で乾燥させることができ、または、流動層凝集の場合、直ちに乾燥させて（凝集機中で）、（固形乾燥）粒状物を得ることができる。食物、飼料または酵素産業において顆粒を乾燥させるための他の既知方法は、当業者によって用いることができる。適当には、粒状物は流動可能である。

乾燥は、好ましくは、25～60℃、例えば30～50℃の温度で行う。ここに、乾燥を10分～数時間、例えば、15～30分続けてもよい。もちろん、必要な時間は乾燥させるべき顆粒の量に依存するが、目安として、これは、顆粒1kgあたり1～2秒である。

顆粒を乾燥後、得られる粒状物は、好ましくは3～10%、例えば5～9%の水分含量を有する。

低ダスト含量、色、酵素の周りの環境からの保護、1の粒状物における種々の

vi

(12)

特表2002-502254

ックス、ポリマー、塩、膏薬 (unguent) および／または軟膏 (ointment) または (第2の) 酵素を含有する被覆剤 (例えば、液体) またはそれらの組み合わせで被覆できる。所望により、(異なる) 被覆の数重の層が適用できることは明らかであろう。粒状物上へ被覆を適用するために、流動層、高剪断造粒機、混合

造粒機またはNautamixerの使用を包含するいくつかの既知方法を利用できる。

他の具体例において、付加的な成分を例えば、加工助剤として、粒状物のペレット成形安定性および／または貯蔵安定性のさらなる改善のために、粒状物中に混合することができる。いくつかのかかる好ましい添加物を後記で検討する。

塩は、(例えば、固形担体または水と一緒に) 粒状物中に含まれてもよい。好ましくは (EP-A-0, 758, 018に示されるように)、無機塩を加えることができ、それは乾燥酵素調製物の加工および貯蔵安定性を改善し得る。好ましい無機塩は、水溶性である。それらは、二価のカチオン、例えば、亜鉛 (特に)、マグネシウムおよびカルシウムを含んでもよい。水溶性を生じる他のアニオンを用いることもできるが、硫酸塩が最も好ましいアニオンである。塩は、固形形態で (例えば、混合物に) 加えてもよい。しかしながら、塩は、固形担体との混合前に、水または酵素含有液中に溶解できる。適当には、塩は、少なくとも15% (酵素に基づくw/w)、例えば、少なくとも30%の量で提供される。しかしながら、それは、少なくとも60%または70%までも (また、酵素に基づくw/w) の高い割合であってもよい。これらの量は、顆粒または粒状物のいずれかに適用することができる。したがって、粒状物は、12% (w/w) 未満、例えば、2.5~7.5%、例えば、4~6%の塩を含んでもよい。

塩が水中で提供されるならば、それは、5~30% (w/w)、例えば、15~25%の量であることができる。

ペレット成形安定性のさらなる改善は、疎水性のゲルを形成するかまたはゆっくり溶解する (例えば、水に) 化合物の混合によって得られ得る。これらは、1~10重量%、例えば2~8重量%、好ましくは4~6重量% (水および固形担体成分の重量に基づく) で提供してもよい。適当な物質は、誘導体化セルロース

(13)

特表2002-502254

、例えば、HPMC（ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、CMC（カルボキシメチルセルロース）、HEC（ヒドロキシエチルセルロース）；ポリビニルアルコール（PVA）；および／または食用油を包含する。しばしば、粒状物はいかなる疎水性物質（例えば、バーム油）も含有しないことが好ましいが、大豆油またはカノーラ油のような食用油は、加工助剤として（例え

ば、造粒されるべき混合物に）加えることができる。

好ましくは、顆粒は、比較的狭いサイズ分布を有する（例えば、それらは単分散である）。このことは、顆粒中での酵素の均一な分散および／または動物飼料中での酵素粒状物の均一な分散を容易にすることができる。本発明の製法は、狭いサイズ分布を有する粒状物を生産する傾向にある。しかしながら、必要に応じて、顆粒のサイズ分布をさらに狭くするために該方法にさらなる工程、例えば、スクリーニングを包含させることができる。粒状物のサイズ分布は、適当には $100\mu\text{m} \sim 2000\mu\text{m}$ 、好ましくは $200\mu\text{m} \sim 1800\mu\text{m}$ 、最適には $300\mu\text{m} \sim 1600\mu\text{m}$ である。顆粒は、不規則な（しかし、好ましくは規則的）形状、例えば、ほぼ球状であってもよい。

水または酵素含有液は、1以上の酵素を含んでもよく、通常、微生物起源、例えば、微生物発酵から得られるものである。通常、酵素は活性化形態であるであろう（例えば、それは触媒的または生理学的活性を有し得る）。好ましくは、液体は、所望の活性レベルを有する粒状物の生産を可能にし得る、限外濾過液（UF）のような濃縮形態である。

適当な酵素は、ペットフードを包含する動物飼料に含まれるべきものである。これらの酵素の機能は、しばしば、例えば、粘性を減少させることによって、またはある特定の飼料化合物の反栄養的効果を減少させることによって、飼料変換率を改善することである。排泄物中の環境に対して有害な化合物の量を減少させるような飼料酵素（例えば、フィターゼ）もまた使用できる。これらの目的に好ましい酵素は：フィターゼ（ α -フィターゼおよび β -フィターゼの両方）のようなホスファターゼおよび／または酸ホスファターゼ；デンプン分解酵素および β -グルカナーゼのようなセルラーゼ、キシラナーゼのようなヘミセルラーゼま

(14)

特表2002-502254

たはガラクターゼを包含する植物細胞壁分解酵素のようなカルボヒドラーゼ；ペプチダーゼ、ガラクトシダーゼ、ペクチナーゼ、エステラーゼ；好ましくは中性および／または酸性のpH最適条件を有するプロテアーゼ；およびリパーゼ、好ましくは、哺乳動物脾臓ホスホリパーゼA2のようなホスホリパーゼである。

好ましくは、酵素は、デンプン分解酵素（例えば、アミラーゼ）を包含しない。いくつかの具体例において、プロテアーゼを摂取すると害になるので、それらを

除外してもよい。

酵素がフィクターゼのようなホスファターゼであるならば、好ましくは、最終的な粒状物は、5,000～10,000、例えば、6,000～8,000 FTU/gの活性を有するであろう。酵素が植物細胞壁分解酵素、例えば、セルラーゼ、特にキシラナーゼのようなヘミセルラーゼであるならば、最終的な粒状物は、3,000～100,000、好ましくは5,000～80,000、最適には8,000～70,000 EXU/gの範囲の酵素活性を有し得る。酵素がβ-グルカナーゼのようなセルラーゼであるならば、最終的な粒状物は、500～15,000、好ましくは1,000～10,000、最適には1,500～7,000 BGU/gの酵素活性を有することができる。

顆粒は、5～20、例えば、7～15%の酵素を含んでもよい。酵素は、天然または組換え体であってもよい。

これらの酵素に加えて、本発明は、例えば、ワクチンにおける使用を見出す抗原決定基のような他の生物学的活性を有するポリペプチドおよび／または高含量の必須アミノ酸を有するように操作されたポリペプチドであって、その生物学的活性が熱不活性化に対して感受性であってもよいポリペプチドに等しく適用でき、本明細書で使用される場合、「酵素」なる語はそれに合うように解釈されるべきである。

したがって、本発明による好ましい製法は：

M

(15)

特表2002-502254

- b. 所望により、得られた混合物を練合し；
 - c. 例えば、機械的な加工処理によって、混合物を造粒して、例えば、造粒機または押出し成形によって、酵素含有顆粒を得；
 - d. 所望により、顆粒を球状にし；
 - e. 得られた顆粒を乾燥させて、酵素含有粒状物を得ることからなる。
- 全工程の間、酵素が曝される最高温度を80℃以下に維持しようとするであろう。

本発明の粒状物は、動物飼料の調製における使用に適する。かかる方法において、プレミックスまたはプレミックスの一部として、粒状物を飼料物質と混合する。本発明の粒状物の特徴は、特に、混合物を蒸気処理し、次いでペレット成形する場合、動物飼料としてよく適する混合物の成分としての使用を可能にする。乾燥顆粒は、かかるペレット中において、目に見えるか、または識別することができる。

したがって、本発明の第3の態様は、第2の態様の粒状物を1以上の動物飼料物質（例えば、シード）または成分と混合することからなる、動物飼料または動物飼料のプレミックスもしくは前駆物質の製法に関する。次いで、これを例えば、熱処理に付して滅菌できる。次いで、得られた組成物を適当には、ペレットに加工処理する。

本発明の第4の態様は、好ましくは、動物飼料のような食用飼料組成物である、第2の態様の粒状物を含んでなる組成物に関する。該組成物は、好ましくは、ペレット形態である（ペレットあたり1-5、例えば、2-4乾燥顆粒が存在していてもよい）。

組成物は、10～20%、例えば、12-15%の水分含量を有することができる。酵素量は、適当には、0.0005～0.0012%、例えば、少なくとも5ppmである。

第5の態様は、動物に第2の態様の粒状物または第4の態様の組成物を含む飼餌を与えることからなる、動物の成長を促進するための方法に関する。ここに、

(16)

特表2002-502254

動物の食餌は、粒状物自体か、または飼料中に存在する粒状物を包含することができる。

適当には、組成物は、0.05～2.0、例えば0.3～1.0、最適には0.4～0.6 FTU/gのホスファターゼ、例えば、フィターゼを含む。キシラナーゼは、0.5～50、例えば、1～40 EXU/gで存在し得る。別法またはさらに、セルラーゼは、0.9.1～1.0、例えば、0.2～0.4 BGU/gで存在し得る。

本発明の第6の態様は、動物飼料中におけるまたは動物飼料の成分としての、あるいは動物食餌における使用のための第2の態様の粒状物の使用に関する。

本発明の第7の態様は、酵素のペレット成形安定性を改善するために、少なくとも15% (w/w) の食用炭水化物ポリマーを酵素の担体として含む組成物の使用に関する。

適当な動物は、飼育動物（豚、家禽、家畜）、非反芻または単胃動物（豚、鳥、家禽、魚のような海洋動物）、反芻動物（牛または羊、例えば、乳牛、羊、ヤギ、シカ、仔牛、仔羊）を包含する。家禽は、ひな鳥、鶏および七面鳥を包含する。

本発明の1の態様の好ましい特色および特徴は、別の必要な変更を加えて、等しく適用できる。

以下の実施例は、単に本発明を説明するものとして与えられ、限定しようとするものではなく、または限定するものとして解釈されるべきではない。

実施例

一般的な材料および方法

Fuji Paudal DG-L1 バスケット押出し成形機を用いて、1.0 mmのスクリーンオープニング、スクリーン厚1.2 mm、作動速度70 rpm および0.6～2.0 Aの電流で押出し成形試験を行った。

粒状成形機 (spheroniser) は、負荷容量3リットル、プレートピッチ3 mm、保持時間45～200秒および回転速度750 rpmのFuji Paudal Marumerizer QJ-400であった。

(17)

特表2002-502254

高剪断造粒試験は、Lödige型高剪断造粒機FM20を用いて、チョッパ速度1500rpmおよびブラウシェア速度100rpmで行った。粉末を造粒機中に入れ、酵素含有液体を上部に噴霧した。得られた粒状物を流動層乾燥機中で乾燥させた。

使用した酵素溶液は：

16840FUT/gの活性を有するアスペルギルス (*Aspergillus*) 誘導ファイターゼおよび22.4% (w/w) の乾燥固体含量の限外濾過液 (実施例1~7)、

12680EXU/gおよびEGU/gのエンドーキシラナーゼおよび β -グルカナーゼ活性のトリコデルマ (*Trichoderma*) 誘導混合物および20.6%

(w/w) の乾燥固体含量を含有する限外濾過液 (実施例8) であった。

ファイターゼ活性は、手法「ISL-法61696」(手動のパナジウム酸塩アッセイ) にしたがって決定した。 β -グルカナーゼ活性は、手法「ISL-法62170」(手動の粘度計アッセイ) にしたがって決定した。エンドーキシラナーゼ活性は、手法「ISL-法62169」(手動の粘度計アッセイ) にしたがって決定した。ISL-法は、Wateringseweg 1, P.O. Box 1, 2600 MA, Delft, The Netherlandsのヒストープロカデス社 (Gist-brocades)、Food Specialties, Agri Ingredients Groupから請求次第、入手できる。

実施例1

練合、押出し成形、球状化および乾燥によるコーンスターチをベースとする酵素粒状物の調製

60% (w/w) のコーンスターチと40% (w/w) のファイターゼを含有する限外濾過液の混合物を混合および練合することによって、酵素調製物を得た。Fuji Paudalバスケット押出し成形機を用いて該混合物を押出し成形して、湿った押出し成形物を得、次いで、それをMARUMERISER™中で1分間球状にして、平均直径780 μ mの丸い粒子を得た。次いで、これらの粒子を流動層乾燥機中、層温度40℃および入口温度75℃で20分間乾燥させた

(18)

特表2002-502254

。約500kgの顆粒を18分で乾燥させた。このように得られた乾燥酵素粒状物は、6980FTU/gの活性を有した。

実施例2

高剪断造粒および乾燥によるコーンスターチをベースとする酵素粒状物の調製
 フィターゼ限外濾過液およびコーンスターチを20リットルのバッチサイズを有するLüdinge型のバッチ型高剪断造粒機中で混合した。造粒機を60% (w/w) のコーンスターチで満たし、混合工程の間、40% (w/w) の限外濾過液を混合機中に噴霧した。限外濾過液の添加後(10分)、造粒機はさらに5分間混合し続けて、粒子を形成および圧縮させた。このように得られた顆粒を

実施例1のように、流動層乾燥機中で乾燥させた。得られた粒状物は、7420FTU/gの活性を有した。粒子のメジアン直径は、480 μ mであった。

実施例3

混合、ペレット成形および乾燥によるコーンスターチをベースとする酵素粒状物の調製

40% (w/w) のフィターゼ限外濾過液および60% (w/w) のコーンスターチの混合物を調製した。押出し成形機の上部で回転しているナイフによって押出し成形物を切断する、直径1mmの穴を含むダイブレードを有するSchlütter Press型PP85を用いて、混合物をペレット成形した。ペレットを実施例1のように乾燥させ、7460FTU/gの活性を有する最終的な生産物を得た。粒子のメジアン直径は、1080 μ mであった。

実施例4

混合、練合、ペレット成形および乾燥による大豆油およびMgSO₄添加を含有するジャガイモデンプンをベースとする酵素粒状物の調製

混合機/練合機に30kgのジャガイモデンプンを加え、2.5kgの大豆油を混合した。次いで、MgSO₄・7H₂Oを含有するフィターゼ限外濾過液(3.5kgのMgSO₄・7H₂Oを14kgの限外濾過液中に溶解した)を加えた。生産物を練合機中で徹底的に混合し、次いで、押出し成形し、実施例1のように流動層乾燥機中で乾燥させた。これは、5870FTU/gの生産物を生じた

(19)

特表2002-502254

。

実施例 5

混合、練合、押出し成形、球状化および乾燥による米デンプンをベースとする酵素粒状物の調製

62% (w/w) の米デンプンおよび38% (w/w) のフィターゼ限外濾過液の混合および練合によって、混合物を調製した。Fuji Paudalバスケット押出し成形機を用いて、該混合物を押出し成形して、湿った押出し成形物

を得、次いで、それをMARUMERISERTM中で1分間球状化して、平均直径785 μ mの丸い粒子を得た。次いで、これらの粒子を実施例1のように流動層乾燥機中で乾燥させた。粒状物の最終的な活性は、7280 FTU/gであった。

実施例 6

混合、練合、押出し成形、球状化および乾燥によるHPMC添加を含有するコーンスターチをベースとする酵素粒状物の調製

54% (w/w) のコーンスターチ、5%のHPMC (ヒドロキシプロピルメチルーセルロース) および41% (w/w) のフィターゼ限外濾過液の混合物を練合することによって、酵素調製物を得た。Fuji Paudalバスケット押出し成形機を用いて、該混合物を押出し成形して、湿った押出し成形物を得、それをMARUMERISERTM中で1分間球状化して、平均直径780 μ mの丸い粒子を得た。次いで、これらを流動層乾燥機中、40℃の層温度および75℃の入口温度で20分間乾燥させた。このように得られた乾燥酵素粒状物は、8470 FTU/gの活性を有した。

実施例 7

混合、練合、押出し成形、球状化および乾燥によるHEC添加を含有するコーンスターチをベースとする酵素粒状物の調製

54% (w/w) のコーンスターチ、5%のHEC (ヒドロキシエチルーセルロース) を41% (w/w) のフィターゼ限外濾過液と混合および練合することによって、酵素調製物を得た。Fuji Paudalバスケット押出し成形

(20)

特表2002-502254

機を用いて、該混合物を押出し成形して、湿った押出し成形物を得、それをMARUMERISER™中で1分間球状化して、平均直径780 μ mの丸い粒子を得た。次いで、これらを流動層乾燥機中、40℃の層温度および75℃の入口温度で20分間乾燥させた。このように得られた乾燥酵素粒状物は、8410FTU/gの活性を有した。

実施例 8

高剪断造粒および乾燥によるコーンスターチをベースとする粒状物の調製
バッチサイズ20リットルを有するLödige型のバッチ型高剪断造粒機中、

60% (w/w) のコーンスターチをエンドーキシラナーゼおよび β -グルカナーゼを含有する40% (w/w) の限外濾過液と以下の方法で混合した。造粒機をコーンスターチで満たし、混合工程の間、限外濾過液を混合機中に噴霧した。限外濾過液の添加後(10分)、造粒機をさらに5分間作動して、粒子を形成および圧縮させた。このように得られた顆粒を実施例1のように流動層乾燥機中で乾燥させた。得られた粒状物は、13100EXU/gおよび5360BGU/gの活性を有した。

実施例 9

ペレット成形安定性の比較

本発明の異なる酵素粒状物をペレット成形試験に付し、それらのペレット成形安定性を標準的な飼料酵素製剤の安定性と比較した。ペレット成形試験は、酵素(粒状物)と飼料プレミックスを1000rpmで混合することからなる。該混合物を蒸気の注入により処理して、70℃に温度上昇させ、その後、混合物をペレット成形機中でペレット成形して飼料ペレットを得、次いで、それを乾燥させた。該型の方法は、飼料ペレットを得るために飼料産業にとって典型的である。

比較のために標準として用いられたフィターゼ含有製剤、NATUPHOS™は、小麦中等品と噴霧乾燥させた限外濾過液の混合物であった。

流動層で調製された顆粒である β -グルカナーゼおよびエンドーキシラナーゼを含有する酵素調製物、NATUGRAIN™は、芯に限外濾過液を噴霧するこ

(21)

特表2002-502254

とによって塗布される、酵素層で塩芯を被覆することによって作製された。

表1は、ペレット成形試験の結果を要約した。標準製剤と比較した場合、炭水化物担体を用いて作製された粒状物により改善されたペレット成形収量が得られたことは、表1から明らかである。

表1：ペレット成形試験の結果

実施例番号	顆粒の酵素活性		70℃でのペレット成形後の酵素収量
	FTU/g	EXU/g BGU/g	%
実施例1	6980	—	54.9
実施例2	7420	—	51.8
実施例3	7460	—	62.8
実施例4	5870	—	62.7
実施例5	7280	—	54.7
実施例6	8470	—	69.6
実施例7	8410	—	67.3
実施例8	—	13100 5360	61.3 25.8
標準NATUPHOS™	5250	—	29.8
標準NATUGRAIN™	—	8150 6030	38.6 10.4

表1から、造粒方法の型、すなわち、機械的加工処理が、本発明により解決されるべき問題に取り組むために重大ではないことは明らかである。炭水化物ポリマーを用いる製剤は、既知のNATUPHOS™およびNATUGRAIN™製剤と比較して、非常により良好なペレット成形安定性を提供した。

(22)

特表2002-502254

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/EP 98/03327

4. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A23K1/00 C11D3/386 //C12N9/98

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

5. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched: JPO/EP/JP system selected by classification symbols:

IPC 6 C11D C12N A23K

Documentation searched prior to the minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

6. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 257 996 A (SUOMEN SOKERI OY) 2 March 1988 cited in the application see abstract see page 2, line 1 - line 6 see page 2, line 55 - page 3, line 47 ---	1-10, 12-27
X	US 3 861 786 A (DESFORGES MALCOM) 9 May 1972 see abstract see column 1, line 60 - column 2, line 30 see column 3, line 28 - column 4, line 6 see claims ---	10, 26, 27
Y	---	1-9
	---	---

☒ Further documents are listed in the continuation of Box 6.☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but after the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or underlying underlying the invention
 "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 1998

Date of mailing of the international search report

14/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 1, Patentstr. 2
 NL - 2000 MB Rijswijk
 Tel (+31) 70 340 2040, Fax (+31) 70 340 2041
 Fax (+31) 70 340 3398

Authorized officer

Panflica, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

(23)

特表2002-502254

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/JP 98/03327

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 758 018 A (GIST BROCADES BV) 12 February 1997 cited in the application see abstract see page 2, line 49 - page 4, line 4 see examples see claims ---	1-21, 23-25
X	EP 0 304 332 A (NOVO INDUSTRI AS) 22 February 1989 see the whole document ---	10-18, 26, 27 1-9
X	DE 33 44 104 A (HENKEL KGAA) 13 June 1985 see the whole document -----	10, 26, 27

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

(24)

特表2002-502254

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 98/03327

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0257996 A	02-03-1988	FI 863393 A AT 123208 T CA 1335544 A DE 3751325 D DE 3751325 T DK 431787 A ES 2074979 T FI 870752 A, B. JP 63157938 A NO 175033 B	23-02-1988 15-06-1995 16-05-1995 06-07-1995 19-10-1995 23-02-1988 01-10-1995 24-08-1988 30-06-1988 16-05-1994
US 3661786 A	09-05-1972	NONE	
EP 0758018 A	12-02-1997	AU 6073296 A CA 2182236 A CN 1159208 A CZ 9700874 A MO 9705245 A JP 9154576 A PL 319347 A SK 40697 A US 5827709 A	06-02-1997 29-01-1997 10-09-1997 18-03-1998 13-02-1997 17-06-1997 04-08-1997 08-10-1997 27-10-1998
EP 0304332 A	22-02-1989	DE 3882301 A DE 3882301 T DK 436888 A, B. JP 1112983 A JP 2647695 B MX 12725 A	19-08-1993 21-10-1993 22-02-1989 01-05-1989 27-08-1997 01-08-1993
DE 3344104 A	13-06-1985	DK 579184 A EP 0168526 A	08-06-1985 22-01-1986

Form PCT/HGAB/10 (patent family search July 2002)

(25)

特表2002-502254

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ハルツ, ハンスーペーター
ドイツ連邦共和国デー67373 デュベン
ホーフェン, アム・モンシュブッシュ22番